

Саливарные факторы роста у пациентов с хроническим пародонтитом

Владимир Викторович Базарный, Лариса Георгиевна Полушина*,
Елена Анатольевна Семенцова, Арина Юрьевна Максимова,
Елена Николаевна Светлакова, Юлия Владимировна Мандра

Уральский государственный медицинский университет,
г. Екатеринбург, Россия

Реферат

Цель. Определить клиническую ценность концентрации факторов роста в ротовой жидкости при хроническом пародонтите лёгкой степени.

Методы. В проспективном исследовании были обследованы 30 пациентов с хроническим пародонтитом лёгкой степени и 20 практически здоровых добровольцев. Диагноз был установлен на основании стандартных клинико-рентгенологических критериев. В пробах ротовой жидкости определяли содержание фактора роста нервов, фактора роста гепатоцитов, эпидермального фактора роста, сосудистого эндотелиального фактора роста А, тромбоцитарного фактора роста ВВ методом мультипараметрического флюоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Luminex 200, USA). Статистический анализ проводили с использованием непараметрических критериев: медиана (Me) и межквартильный диапазон (Q₁, Q₃). Для определения клинической ценности параметров использован ROC-анализ.

Результаты. Было показано, что развитие хронического пародонтита сопровождается повышением уровня фактора роста нервов β в 2,2 раза, эпидермального фактора роста в 3 раза, сосудистого эндотелиального фактора роста типа А в 1,9 раза ($p < 0,05$) в сравнении с контролем. Концентрация тромбоцитарного фактора роста ВВ не изменялась. С помощью ROC-анализа были определены диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность изученных показателей, которые составили для фактора роста нервов β 89,1 и 91,1%, для эпидермального фактора роста — 92,3 и 96,1%, для сосудистого эндотелиального фактора роста типа А — 87,1 и 95,3% соответственно.

Вывод. Саливарные ростовые факторы (фактор роста нервов β , эпидермальный фактор роста, сосудистый эндотелиальный фактор роста А) можно рассматривать в качестве потенциальных биомаркёров хронического пародонтита лёгкой степени.

Ключевые слова: факторы роста, ротовая жидкость, хронический пародонтит.

Для цитирования: Базарный В.В., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Мандра Ю.В. Саливарные факторы роста у пациентов с хроническим пародонтитом. *Казанский мед. ж.* 2021; 102 (5): 636–641. DOI: 10.17816/KMJ2021-636.

Salivary growth factors in patients with chronic periodontitis

V.V. Bazarnyi, L.G. Polushina, E.A. Sementsova, A.Yu. Maksimova, E.N. Svetlakova, J.V. Mandra
Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

Abstract

Aim. To determine the clinical value of the growth factors concentration in the oral fluid in patients with mild chronic periodontitis.

Methods. A prospective study including 30 patients with chronic periodontitis and 20 healthy volunteers was conducted. The diagnosis was made based on standard clinical and radiological criteria. Nerve growth factor β (NGF- β), hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) were determined in oral fluid samples by using multiparametric fluorescence analysis with magnetic microspheres (xMAP technology, Luminex 200, USA).

Statistical analysis was performed using nonparametric measures: median (Me) and interquartile range (Q_1 , Q_3). Receiver operating characteristic (ROC) analysis was used to determine the clinical value of the parameters.

Results. The chronic periodontitis was accompanied by an increase in the level of nerve growth factor- β by 2.2 times, epidermal growth factor by 3 times, vascular endothelial growth factor A by 1.9 times ($p < 0.05$) compared with the control. The platelet-derived growth factor BB concentration did not change. Using the ROC analysis, diagnostic sensitivity and diagnostic specificity of the studied parameters were determined: 89.1 and 91.1% for nerve growth factor β , 92.3 and 96.1% for epidermal growth factor, 87.1 and 95.3% for vascular endothelial growth factor A, respectively.

Conclusion. Salivary growth factors (nerve growth factor β , epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor A) can be considered as potential biomarkers of mild chronic periodontitis.

Keywords: growth factors, oral fluid, chronic periodontitis.

For citation: Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Sementsova E.A., Maksimova A.Yu., Svetlakov E.N., Mandra J.V. Salivary growth factors in patients with chronic periodontitis. *Kazan Medical Journal*. 2021; 102 (5): 636–641. DOI: 10.17816/KMJ2021-636.

Актуальность. Хронический пародонтит (ХП) относится к числу наиболее распространённых заболеваний на планете. По данным ряда авторов, им поражены 10–15% населения Земли [1]. Важными факторами развития заболевания считают зубной налёт и плохую гигиену, приводящие к воспалительному поражению десны. Однако этого может быть недостаточно, чтобы вызвать повреждение тканей пародонта. По этой причине принято считать, что наиболее существенную роль в патогенезе ХП имеет дисбаланс между иммунной системой и пародонтогенными микроорганизмами [2–5].

Сложный комплекс развивающихся при ХП межклеточных реакций в тканях пародонта регулируется иммунокомпетентными клетками (нейтрофилами, дендритными клетками, лимфоцитами, макрофагами, плазмócитами) и синтезируемыми ими цитокинами [6]. Среди последних особое место занимают факторы роста [7]. Это большое семейство полипептидных сигнальных молекул, которые регулируют клеточные реакции при воспалении и регенерации — миграцию, пролиферацию и дифференцировку. Также они влияют на активность апоптоза, ангиогенез и другие разнообразные физиологические и патологические процессы в тканях [8–10].

Значению цитокинов при ХП посвящено значительное количество публикаций. Однако существенно меньше работ, освещающих содержащиеся в слюне/ротовой жидкости (РЖ) факторы роста (ФР) при данном заболевании [9, 11, 12]. В частности, показано, что уровень ФР гепатоцитов (HGF — от англ. hepatocyte growth factor) коррелирует с активностью заболевания, также на него влияет курение [13]. Показано изменение в слюне концентрации ФР эндотелия сосудов (VEGF — от англ. vascular endothelial growth factor), фактора некроза

опухоли, фактора, индуцируемого гипоксией, ФР соединительной ткани при заболеваниях пародонта [8, 10]. Однако целостная картина патогенетической роли ФР при ХП пока не завершена. Полученные разными авторами данные порой противоречивы. Кроме того, вопрос о клинико-диагностическом значении определения концентрации ФР в РЖ при ХП далёк от окончательного решения.

Цель исследования — определить клиническую ценность концентрации ФР в РЖ при ХП лёгкой степени.

Материал и методы исследования. В проспективном исследовании типа «случай-контроль» были обследованы 30 пациентов с ХП лёгкой степени (основная группа) и 20 практически здоровых добровольцев без патологии пародонта (контрольная группа). Возраст пациентов в основной группе составил 18–46 лет (медиана 39 лет), в группе сравнения — 19–38 лет (медиана 37 лет). Соотношение женщин и мужчин в основной группе составило 1,1, в группе сравнения — 1,0. Различий по половозрастному составу и структуре сопутствующей соматической патологии не установлено.

У пациентов основной группы диагноз ХП лёгкой степени (K05.3 по Международной классификации болезней 10-го пересмотра) был установлен на основании клинико-рентгенологических критериев в соответствии с клиническими рекомендациями (протоколами лечения), утверждёнными Стоматологической ассоциацией России (2013) с изменениями и дополнениями [<http://www.e-stomatology.ru/director/protokols/>]. Критериями включения в основную группу были возраст пациента 18–50 лет, общесоматическое состояние пациентов в стадии компенсации, отсутствие сопутствующих соматических заболеваний в стадии декомпенсации.

Пациенты основной группы предъявляли жалобы на кровоточивость дёсен при чистке зубов, наличие зубных отложений и чувствительность зубов. При клиническом обследовании у них выявлены гиперемия и отёк папиллярной, маргинальной десны, кровоточивость при зондировании. Зубодесневое прикрепление было нарушено (ключевой клинико-диагностический признак), глубина пародонтальных карманов составляла 4–4,5 мм. У некоторых пациентов отмечена некоторая рецессия десны (1–2 мм), сопровождавшаяся развитием повышенной чувствительности зубов. Подвижность зубов была физиологической. У всех пациентов основной группы в пришеечной области зубов определены минерализованные и неминерализованные зубные отложения.

Пациенты контрольной группы не предъявляли жалоб, связанных с состоянием дёсен, и имели условно здоровый пародонт. При клиническом обследовании папиллярная, маргинальная десна была бледно-розовой без видимых патологических изменений. Зубодесневое прикрепление нарушено не было, десна плотно прилежала к шейкам зубов. Рецессий десны не определено. Подвижность зубов была физиологической. У всех пациентов контрольной группы отмечен хороший уровень индивидуальной гигиены полости рта.

Клиническое обследование и лечение пациентов проведено в стоматологической клинике ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. При проведении исследований соблюдали этические принципы, принятые Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000). Проведение данного исследования было одобрено локальным этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (протокол №3 от 19.03.2021).

Наряду с основными методами клинического обследования оценивали стоматологические индексы: упрощённый индекс гигиены полости рта по Green–Vermillion (1964), папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс в модификации С. Parma (1960), пародонтальный индекс Рассела.

У всех обследованных исследовали нестимулированную РЖ, которую получали не ранее чем через 3 ч после приёма пищи, полоскания полости рта и собирали в пробирки Saliva Caps Set, а затем замораживали. Исследование выполнено в соответствии с разработанным в нашей лаборатории протоколом. Пробы хранили при температуре –40 °С не более 3 мес. В пробах РЖ определяли ФР нервов β (NGF-β — от

англ. nerve growth factor), HGF, эпидермальный ФР (EGF — от англ. epidermal growth factor), VEGF-A, тромбоцитарный ФР (PDGF-BB — от англ. platelet-derived growth factor).

Концентрацию ФР определяли методом мультипараметрического флуоресцентного анализа с магнитными микросферами (xMAP-технология, Luminex 200, USA) с использованием тест-систем ProcartaPlex Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor Panel 1 (45 plex) Invitrogen, eBioscience (USA). Исследование проводили согласно протоколу производителя. Биологический образец инкубировали в 96-луночном планшете со смесью окрашенных инфракрасными флуоресцентными красителями магнитных микросфер, нагруженных моноклональными антителами, специфичными для исследуемых цитокинов, и стрептавидин-R-фикоэритрина.

Полученную суспензию пропускали через проточную камеру Luminex 200. Для обнаружения магнитных частиц прибор имеет два лазера: красный для различения спектральной сигнатуры и зелёный для определения уровня флуоресценции стрептавидин-R-фикоэритрина, который пропорционален количеству белка в пробе. Концентрацию каждого ФР рассчитывали на основе средней интенсивности флуоресценции частиц по калибровочному графику с помощью программного обеспечения xPONENT.

Статистическая обработка данных проведена с использованием непараметрических критериев. Результаты в таблицах представлены как медиана (Me), и межквартильный диапазон (Q₁, Q₃). Достоверность различий (p) оценивали при помощи критерия Манна–Уитни.

Для определения клинической ценности параметров рассчитывали диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность, использован ROC-анализ в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические». Кроме того, оценивали прогностическую ценность положительного результата (ПЦ) по формуле:

$$\text{ПЦ} = [\text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛП})] \times 100\%,$$

где ИП — истинно положительный результат; ЛП — ложноположительный результат.

Для решения задач многомерной статистики использовали программу Gretl, расчёт диагностических характеристик показателей и прогностической ценности производился с использованием приложения для EXEL 2007 Analyse-it.

Результаты и обсуждение. Объективными показателями состояния полости рта служат стоматологические индексы пародонтального

Таблица 1. Концентрация ростовых факторов при хроническом пародонтите

Ростовые факторы, пкг/мл	Контрольная группа	Основная группа (хронический пародонтит)	p
NGF-β, Me (Q ₁ ; Q ₃)	17,6 (8,8–28,0)	38,4 (6,3–49,03)	0,001
HGF, Me (Q ₁ ; Q ₃)	781,5 (408,7–1405,9)	341,3 (196,9–790,6)	0,02
EGF, Me (Q ₁ ; Q ₃)	116,2 (74,5–303,7)	357,3 (334,0–510,2)	0,001
VEGF-A, Me (Q ₁ ; Q ₃)	144,4 (72,2–858,4)	269,0 (185,5–814,1)	0,03
PDGF-BB, Me (Q ₁ ; Q ₃)	24,4 (12,2–15,2)	24,0 (6,6–74,7)	0,07

Примечание: NGF-β — фактор роста нервов β; HGF — фактор роста гепатоцитов; EGF — эпидермальный фактор роста; VEGF-A — фактор роста эндотелия сосудов; PDGF-BB — тромбоцитарный фактор роста.

Таблица 2. Диагностическая ценность факторов роста в ротовой жидкости при хроническом пародонтите

Показатель	Критическая точка	Диагностическая чувствительность, %	Диагностическая специфичность, %	AUC	Ценность положительного результата, %
NGF-β	32,9	89,1	91,1	0,89	85
HGF	333,1	87,2	87,6	0,78	69
EGF	345,2	92,3	96,1	0,93	91
VEGF-A	284,8	87,1	95,3	0,92	90
PDGF-BB	12,4	85,7	62,1	0,69	62

Примечание: NGF-β — фактор роста нервов β; HGF — фактор роста гепатоцитов; EGF — эпидермальный фактор роста; VEGF-A — фактор роста эндотелия сосудов; PDGF-BB — тромбоцитарный фактор роста.

здоровья (папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс и пародонтальный индекс Рассела) и упрощённый индекс гигиены полости рта. Их значения были заметно повышены у пациентов с ХП, например величина папиллярно-маргинально-альвеолярного индекса была в 4,5 раза выше, чем у пациентов контрольной группы ($p < 0,05$), что подтверждает корректность установленного диагноза и отражает заметное нарушение пародонтального здоровья.

Механизмы повреждения ткани пародонта разнообразны, и, как было показано выше, в них участвуют ФР [13–15]. Это послужило обоснованием для определения концентрации некоторых из них в РЖ при ХП (табл. 1). В результате было установлено повышение уровня NGF-β в 2,2 раза, EGF — в 3 раза, VEGF — в 1,9 раза ($p < 0,05$) в сравнении с добровольцами с интактным пародонтом. Концентрация PDGF-BB не изменялась.

Полученные нами результаты об изменении концентрации нейропептидов и ФР соответствуют данным других авторов [8, 13]. Однако вопрос о том, можно ли считать эти ФР биомаркерами ХП, остаётся открытым.

Объективным инструментом для оценки клинической ценности лабораторных тестов —

диагностической чувствительности и диагностической специфичности — служит ROC-анализ. Такой подход показал, что наибольшей клинической ценностью обладают NGF-β, EGF и VEGF-A (табл. 2).

В дополнение к диагностической чувствительности и диагностической специфичности была рассчитана предсказательная ценность положительного результата. Этот показатель в отличие от чувствительности и специфичности зависит от распространённости заболевания. Учитывая, что распространённость ХП у населения старше 30 лет достаточно высока, положительный результат теста делает более вероятными кандидатами на роль биомаркёров воспаления и повреждения тканей пародонта при ХП такие ФР, как NGF-β, EGF, VEGF-A. В то же время прогностическая ценность других ФР — HGF и PDGF-BB — низка, что не позволяет рассматривать данные параметры в качестве биомаркёров ХП.

Исследование слюварного протеома, в частности определение концентрации цитокинов в РЖ, представляет собой новое направление в пародонтологии. В предыдущих исследованиях нами получены многочисленные данные о повышении содержания цитокинов, острофа-

зовых белков, матриксных металлопротеиназ и других пептидов, некоторые из которых служат биомаркерами поражения пародонта и других заболеваний [2, 3, 6].

В настоящее время авторы обсуждают вопрос о возможности использования ФР в качестве биомаркеров ХП. К примеру, М.М. Taskan и соавт. (2019) в своём исследовании показали, что концентрация VEGF при ХП снижается в сравнении с контрольной группой [16]. Возможно, сказанное выше противоречит нашим данным, потому что исследование РЖ проведено у пациентов с высокой степенью активности ХП.

Один из участвующих в патогенезе ХП цитокинов — NGF- β , поскольку он стимулятор пролиферации и дифференцировки не только нейронов, но и буккального эпителия, а также является одним из медиаторов боли, сопровождающей развитие данного заболевания [17–19]. В свете этого мы считаем вполне закономерным установленное нами повышение саливарного уровня NGF- β .

Аналогичные изменения в РЖ при ХП обнаружены и со стороны уровня EGF, что расценено нами как один из компенсаторных механизмов, направленных на повышение сниженного репаративного потенциала десны. Возможно, при тяжёлом поражении пародонта данный показатель будет снижен. Как было отмечено выше, наши данные не в полной мере согласуются с результатами исследования некоторых авторов [14]. Это относится к определению уровня PDGF-BB в РЖ при ХП, который оставался неизменным у пациентов в нашем исследовании. Вероятно, полученный результат связан с тем обстоятельством, что наше исследование проведено у пациентов с лёгкой степенью ХП, а нарастание концентрации PDGF-BB характерно для тяжёлого течения ХП.

В целом полученные данные укладываются в современную концепцию патогенеза ХП, подчёркивая вклад ФР в механизмы развития воспаления, пролиферации и неоангиогенеза [11].

ВЫВОДЫ

1. Настоящее исследование показало, что при хроническом пародонтите происходит изменение уровня фактора роста гепатоцитов, фактора роста нервов β , сосудистого эндотелиального фактора роста и эпидермального фактора роста в ротовой жидкости при лёгкой степени хронического пародонтита, что подтверждает их активное участие в патогенезе заболевания.

2. Фактор роста нервов β , сосудистый и эпидермальный факторы роста характеризуются достаточной клинической ценностью и претен-

дуют на роль кандидатов-биомаркеров лёгкой степени хронического пародонтита.

Участие авторов. В.В.Б. — руководитель работы, разработка концепции исследования, редактирование текста; Л.Г.П. — выполнение иммунохимических исследований, анализ данных, написание текста, оформление рукописи; Е.А.С. и Е.Н.С. — сбор клинического материала, консультирование пациентов; А.Ю.М. — выполнение иммунохимических исследований, статистический анализ данных; Ю.В.М. — консультация клинической части исследования.

Источник финансирования. Данная работа проведена в рамках государственного задания «Предикторы старения в полости рта и возможность их использования для персонификации стоматологического лечения», госрегистрация №121032300110-4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gross A.J., Paskett K.T., Cheever V.J., Lipsky M.S. Periodontitis: a global disease and the primary care provider's role. *Postgrad Med. J.* 2017; 93 (1103): 560–565. DOI: 10.1136/postgradmedj-2017-134801.
2. Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Мандра Ю.В. Патогенетическое обоснование новых подходов к оценке состояния тканей полости рта при хроническом генерализованном пародонтите. *Пробл. стоматол.* 2018; 14 (4): 14–18. [Bazarnyy V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Yu., Svetlakova E.N., Mandra Yu.V. Pathogenetic substantiation of new approaches to assessing the state of oral cavity tissues in chronic generalized periodontitis. *Problemy stomatologii.* 2018; 14 (4): 14–18. (In Russ.)] DOI: 10.18481/2077-7566-2018-14-4-14-18.
3. Полушина Л.Г., Светлакова Е.Н., Семенцова Е.А., Мандра Ю.В., Базарный В.В. Клинико-патогенетическое значение некоторых цитокинов при пародонтите. *Мед. иммунол.* 2017; 19 (6): 803–806. [Polushina L.G., Svetlakova E.N., Sementsova E.A., Mandra Yu.V., Bazarnyy V.V. Clinico-pathogenetic value of some cytokines in periodontitis. *Medical Immunology.* 2017; 19 (6): 803–806. (In Russ.)] DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-803-806.
4. Alamehadi A.H., Alghamdi F. Biomarkers of alveolar bone resorption in gingival crevicular fluid: A systematic review. *Arch. Oral Biol.* 2018; 93: 12–21. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2018.05.004.
5. Lorenzo-Pouso A.I., Pérez-Sayáns M., Bravo S.B., López-Jornet P., García-Vence M., Alonso-Sampedro M., Carballo J., García-García A. Protein-based salivary profiles as novel biomarkers for oral diseases. *Dis. Markers.* 2018; 2018: 6141845. DOI: 10.1155/2018/6141845.
6. Базарный В.В., Полушина Л.Г., Семенцова Е.А., Светлакова Е.Н., Береснева Н.С., Мандра Ю.В., Цвиренко С.В. Значение некоторых интерлейкинов в патогенезе пародонтита. *Вестн. Уральской мед. акад. науки.* 2017; 14 (1): 35–39. [Bazarnyy V.V., Polushina L.G., Sementsova E.A., Svetlakova E.N., Beresneva N.S., Mandra Yu.V., Tsvirenko S.V. The interleukins in the pathoge-

nesis of periodontitis. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2017; 14 (1): 35–39. (In Russ.)]

7. Li S., Gu X., Yi S. The regulatory effects of transforming growth factor- β on nerve regeneration. *Cell Transplant.* 2017; 26 (3): 381–394. DOI: 10.3727/096368916X693824.

8. Afacan B., Öztürk V.Ö., Paşalı Ç., Bozkurt E., Köse T., Emingil G. Gingival crevicular fluid and salivary HIF-1 α , VEGF, and TNF- α levels in periodontal health and disease. *J. Periodontol.* 2019; 90 (7): 788–797. DOI: 10.1002/JPER.18-0412.

9. Angiero F., Ugolini A., Cattoni F., Bova F., Blasi S., Gallo F., Cossellu G., Gherlone E. Evaluation of bradykinin, VEGF, and EGF biomarkers in gingival crevicular fluid and comparison of PhotoBioModulation with conventional techniques in periodontitis: a split-mouth randomized clinical trial. *Lasers Med. Sci.* 2020; 35 (4): 965–970. DOI: 10.1007/s10103-019-02919-w.

10. Choi Y., Yoo J.H., Lee J.H., Lee Y., Bae M.K., Kim Y.D., Kim H.J. Connective tissue growth factor (CTGF) regulates the fusion of osteoclast precursors by inhibiting Bcl6 in periodontitis. *Int. J. Med. Sci.* 2020; 17 (5): 647–656. DOI: 10.7150/ijms.41075.

11. Smith P.C., Martínez C., Cáceres M., Martínez J. Research on growth factors in periodontology. *Periodontol.* 2000. 2015; 67 (1): 234–250. DOI: 10.1111/prd.12068.

12. Zekeridou A., Mombelli A., Cancela J., Courvoisier D., Giannopoulou C. Systemic inflammatory burden and local inflammation in periodontitis: What is the link between inflammatory biomarkers in serum and gingival crevicular fluid? *Clin. Exp. Dent. Res.* 2019; 5 (2): 128–135. DOI: 10.1002/cre2.162.

13. Guru S., Sam S.E., Rajan S., Padmanabhan S. Comparative evaluation of salivary hepatocyte growth factor

in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J. Investig. Clin. Dent.* 2018; 9 (2): e12306. DOI: 10.1111/jicd.12306.

14. Romano F., Bongiovanni L., Bianco L., Di Scipio F., Yang Z., Sprio A.E., Berta G.N., Aimetti M. Biomarker levels in gingival crevicular fluid of generalized aggressive periodontitis patients after non-surgical periodontal treatment. *Clin. Oral Investig.* 2018; 22 (2): 1083–1092. DOI: 10.1007/s00784-017-2192-1.

15. Li W., Zhang Z., Wang Z. Differential immune cell infiltrations between healthy periodontal and chronic periodontitis tissues. *BMC Oral Health.* 2020; 20 (1): 293. DOI: 10.1186/s12903-020-01287-0.

16. Taskan M.M., Karatas O., Balci Yuce H., Isiker Kara G., Gevrek F., Ucan Yarkac F. Hypoxia and collagen crosslinking in the healthy and affected sites of periodontitis patients. *Acta Odontol. Scand.* 2019; 77 (8): 600–607. DOI: 10.1080/00016357.2019.1624819.

17. Coelho J.M.F., Miranda S.S., da Cruz S.S., Trindade S.C., Passos-Soares J.S., Cerqueira E.M.M., Costa M.D.C.N., Figueiredo A.C.M.G., Hintz A.M., Barreto M.L., Seymour G.J., Scannapieco F., Gomes-Filho I.S. Is there association between stress and periodontitis? *Clin. Oral Investig.* 2020; 24 (7): 2285–2294. DOI: 10.1007/s00784-019-03083-9.

18. Haririan H., Andrukhov O., Böttcher M., Pablik E., Wimmer G., Moritz A., Rausch-Fan X. Salivary neuropeptides, stress, and periodontitis. *J. Periodontol.* 2018; 89 (1): 9–18. DOI: 10.1902/jop.2017.170249.

19. Jasim H., Ghafouri B., Carlsson A., Hedenberg-Magnusson B., Ernberg M. Daytime changes of salivary biomarkers involved in pain. *J. Oral Rehabil.* 2020; 47 (7): 843–850. DOI: 10.1111/joor.12977.